

3. Fukuhara K., Matsuki Y., Nanbara T. Simultaneous determination of theobromine, theophylline and caffeine in foods by high-performance liquid chromatography// Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi. – 1985 – 26 (2). – С. 208-212.

4. Hagenauer Hener U., Hener U., Dettmar F., Mosandl A. LiChrospher 60 RP-select B in HPLC analysis of foods// Kontakte. – 1989. – №1. – С. 24-29.

5. Marx F., Pfeilsticker K., Maia J. G. S. Analysis of guarana (Paullinia cupana var. sorbilis). I. Determination of caffeine, theobromine and theophylline in guarana seeds by HPLC// Dtsch. Lebensm. Rundsch. – 1985. – 81(12). – С. 390-392.

6. Rubach K., Kirchhoff E. Comparative investigation of conventional and short-time roasted coffee// Kaffee-Tee-Markt – 1984 – 34(4). – С. 3-6.

7. Terada H., Sakabe Y. High-performance liquid-chromatographic determination of theobromine, theophylline and caffeine in food products// J. Chromatography – 1984. – С. 291, 453-459.

8. Terada H., Suzuki A., Tanaka H., Yamamoto K.S.O. Determination of catechins and methylxanthines in foodstuffs by semi-micro high-performance liquid chromatography// Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi – 1992. – 33 (4). – С. 347-354.

9. Vergnes M.F., Alary J. Determination of natural xanthines by HPLC. Comparison of methods and applications// Talanta – 1986. – 33(12). – С. 997-1000.

### SUMMARY

D.V.Moiseev, A.I.Zhebentayev, P.T.Petrov  
DETERMINATION OF SOME PURINE  
ALKALOIDS IN TEA, COFFEE AND CACAO BY HPLC

Fast and simple procedure for the determination of theobromine, theophylline and caffeine in tea, coffee and cacao by HPLC is described. A reversed-phase column (Zorbax SB C-18, 250x4,6 mm, 5 mcm) with isocratic elution by MP (water and acetonitrile 90:10 in volume) is used. The calibration graph for this substances was linear from 1-200 mcg/ml (RSD <3%).

Ю.А.Голяк, О.М.Хишова

### КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИРИДОИДОВ В РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЯХ ПУСТЫРНИКА ПЯТИЛОПАСТНОГО

Витебский государственный  
медицинский университет

*Изучено накопление иридоидов в различных частях пустырника пятилопастного. Установлен оптимальный период заготовки и подобраны условия сушки листьев пустырника пятилопастного.*

Лекарственные средства на основе пустырника применяются в медицинской практике в качестве кардиотонического и регулирующего ритм сердечной деятельности средства при сердечно-сосудистых неврозах, стенокардии и гипертонической болезни [1, 2, 4, 5, 8]. В начале 20 века пустырник стали использовать как седативное средство [8]. В научной медицине сегодня широко применяют пустырник сердечный и пустырник пятилопастной. В качестве лекарственного сырья у этих видов пустырника используется трава [3].

В траве пустырника содержатся флавоноиды (от 0,2 до 0,5 %): рутин, кверцетин, 7-глюкозид кверцетина, кверцетрин, квинквелозид, гиперозид; алкалоиды (0,05 %): стахидрин - бетаин тетрааммониевого основания гириновой кислоты (0,015 %) и леонурин, причем стахидрин обнаруживается лишь в начале цветения; дитерпеноиды: леокардин; сердечные гликозиды, эфирное масло (от 0,003 до 0,09 %); дубильные вещества (от 2 до 9 %); сапонины; горькие и сахаристые вещества; следы ретинола и аскорбиновой кислоты; паракумаровая кислота [6, 7, 9, 10].

Седативное действие травы пустырника обусловлено присутствием различных групп биологически активных веществ. Однако в настоящее время большинство авторов считают, что седативный эффект травы пустырника и лекарственных средств на ее основе обусловлен иридоидами (аюгол, аюгозид, гарпагид и гарпагида ацетат). Известно, что стебли, цвет-

\*\*\*\*\*

ки и листья пустырника содержат различное количество иридоидов [9].

Целью нашего исследования явилось изучение качественного и количественного содержания иридоидов в стеблях, листьях, цветках и определение оптимального периода заготовки, температуры сушки предложенного сырья пустырника пятилопастного.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования были стебли, листья и цветки пустырника пятилопастного следующих серий:

1) культивируемое сырье:

102003: п. Улановичи, Витебская область, сбор 2004 г.

112004: Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, сбор 2004 г.

102005: п. Улановичи, Витебская область, сбор 2005 г.

2) дикорастущее сырье:

122003: г. Поставы, Витебская область, сбор 2004 г.

132003: г. Любань, Минская область, сбор 2004 г.

112005: г. Гродно, сбор 2005 г.

*Методика количественного определение иридоидов, в пересчете на гарпагида ацетат, в листьях, цветках и стеблях пустырника пятилопастного [9]:* сырье измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 5,0 г (точная навеска) сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 80 мл спирта этилового 40 %. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через ватный тампон в мерную колбу вместимостью 100 мл. Ватный тампон с сырьем снова помещают в колбу для экстрагирования, прибавляют 40 мл спирта этилового 40 % и повторяют экстрагирование указанным выше способом в течение 15 мин. Охлаждают и фильтруют извлечение через ватный тампон в ту же мерную колбу. Доводят объем извлечения

спиртом этиловым 40 % до метки и перемешивают.

10 мл фильтрата упаривают до 5 мл и доводят объем до 10 мл водой очищенной. Фильтруют через стеклянную колонку диаметром 1 см с 3 г алюминия окиси для хроматографии 2 степени активности. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 5 мл элюата, прибавляют 5 мл щелочного раствора гидроксилamina и выдерживают 5 мин. Прибавляют 10 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной, доводят объем раствором железа окисного хлорида 1 % в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной до 25 мл, перемешивают.

Измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 512 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 5 мл воды очищенной, 5 мл щелочного раствора гидроксилamina, 10 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной, доведенный раствором железа окисного хлорида 1 % в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы иридоидов в сырье пустырника в пересчете на гарпагида ацетат и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25}{56,03 \cdot 5 \cdot m \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

где

D - оптическая плотность испытуемого раствора;

56,03 - удельный показатель поглощения продуктов гидроксамовой реакции гарпагида ацетата;

m - масса сырья в граммах;

W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

*Методика качественного определения иридоидов в листьях, цветках и стеблях пустырника пятилопастного [9]:* 10 мл извлечения, полученного для количественного определения (см. раздел «Количественное определение»), пропускают через стеклянную колонку диаметром 1 см с 3 г алюминия окиси для хроматографии II степени активности (раствор А). На линию

старта пластинки "Силуфол УФ-254" размером 5×15 см наносят по 0,05 мл вытяжки, полученной из листьев и цветков пустырника пятилопастного, для вытяжки, полученной из стеблей - 0,08 мл. Хроматографируют восходящим способом в системе растворителей хлороформ: метанол: вода (80:2:0,1). Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры и сушат на воздухе

до удаления растворителя. Пластинку обрабатывают реактивом Штала и выдерживают в сушильном шкафу при температуре  $(100 \pm 5)^\circ\text{C}$  в течение 5 мин. Наблюдают, какое количество пятен сиреневого цвета проявляется на хроматограмме.

Результаты количественного определения иридоидов в листьях, цветках и стеблях пустырника пятилопастного представлены в табл. 1.

Таблица 1

Содержание иридоидов, в пересчете на гарпагида ацетат в листьях, цветках и стеблях пустырника пятилопастного

(n = 5, P = 0,95)

Серия	Части растения	Найдено иридоидов (в персчете на гарпагида ацетат), $(\bar{X} \pm \Delta \bar{X})$ , %
102003	стебли	0,23±0,02
	листья	0,49±0,02
	цветки	0,46±0,03
112004	стебли	0,27±0,02
	листья	0,57±0,02
	цветки	0,56±0,02
102005	стебли	0,27±0,01
	листья	0,54±0,03
	цветки	0,51±0,02
122003	стебли	0,26±0,02
	листья	0,62±0,02
	цветки	0,63±0,02
132003	стебли	0,25±0,02
	листья	0,44±0,02
	цветки	0,47±0,02
112005	стебли	0,27±0,02
	листья	0,55±0,02
	цветки	0,51±0,02

Из данных, представленных в табл. 1 видно, что в листьях содержится от 0,42 % до 0,65 %, в цветках от 0,44 % до 0,64 %, в стеблях от 0,21 % до 0,29 % иридоидов. В листьях и цветках пустырника пятилопастного содержится в 2 раза больше иридоидов, чем в стеблях.

Сопоставление качественного состава иридоидов вытяжки из листьев, цветков и травы пустырника пятилопастного проводили на основании данных ТСХ-анализа. На ТСХ-хроматограмме вы-

тяжки из листьев и из цветков пустырника пятилопастного обнаружили одинаковое количество пятен сиреневого цвета (от 5 до 8), в извлечении из стеблей количество пятен не превышало 3.

Доброкачественность растительного сырья в значительной степени зависит от соблюдения сроков заготовки, правильной технологии сбора и режима сушки. Для анализа использовали листья соцветий и стеблевые листья. Полученные данные приведены в табл. 2.

**Динамика накопления иридоидов  
в листьях пустырника пятилопастного**

(n = 5, P = 0,95)

Дата заготовки	Содержание иридоидов в листьях соцветий, ( $\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$ ), %	Содержание иридоидов в стеблевых листьях, ( $\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$ ), %
01.06.05	-----	0,43±0,02
15.06.05	0,50±0,01	0,55±0,02
30.06.05	0,54±0,03	0,55±0,02
24.07.05	0,55±0,01	0,54±0,01
10.08.05	0,52±0,02	0,51±0,02

Из табл. 2 видно, что в период конец июня – конец июля содержание иридоидов в листьях пустырника пятилопастного было наибольшим. Рекомендательный период заготовки листьев пустырника пятилопастного – конец июня – конец июля (фаза цветения).

Для определения оптимальной температуры сушки листа и цветка пустырника пятилопастного высушивали при различной температуре: (15 – 25) °С; 40 °С; 60 °С; 80 °С; 100 °С. Определяли содержание иридоидов в высушенном сырье. Результаты исследований приведены в табл. 3.

Таблица 3

**Влияние температуры сушки на содержание иридоидов  
в листьях и цветках пустырника пятилопастного**

(n = 5, P = 0,95)

Содержание иридоидов, ( $\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$ ), %	Температура сушки, °С				
	15 - 25	40	60	80	100
в листьях	0,54±0,03	0,52±0,01	0,52±0,02	0,53±0,02	0,52±0,01
в цветках	0,51±0,02	0,50±0,02	0,50±0,02	0,51±0,01	0,51±0,02

### ЛИТЕРАТУРА

Из данных, представленных в табл. 3 видно, что температура сушки не влияет на количественное содержание иридоидов в листьях и цветках пустырника пятилопастного. Сушку можно проводить как естественным способом (от 15 до 25 °С), так и при более высоких температурах.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований целесообразно использовать в качестве лекарственного растительного сырья листья и цветки пустырника пятилопастного. Максимальное содержание иридоидов в листьях содержится в фазу цветения. Температура сушки не влияет на количественное содержание иридоидов в листьях и цветках пустырника пятилопастного.

1. Гончарова Т.А. Энциклопедия лекарственных растений. – М.: Изд. Дом МСП, 1999. - №1 – 560 с.

2. Гончарова Т.А. Энциклопедия лекарственных растений. – М.: Изд. Дом. МСП, 1999. - №2 – 528 с.

3. Государственная фармакопея СССР XI издания: В 2 т. / МЗ СССР. – М.: Медицина, 1989. - Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. - 398 с.

4. Максютин Н.П., Комиссаренко Н.Ф., Прокопенко А.П. и др. Растительные лекарственные средства. – К.: Здоров'я, 1985. – 280 с.

5. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2002. - №1. – 540 с.

6. Попов Д.М., Пашинская Е.В., Коваленко Л.И. Контроль качества сырья препаратов пустырника спектрофотометрическим методом// Фармация. – 1992. - № 4 – С. 27-31.

7. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Hippuridaceae – Lobeliaceae. - СПб: Наука, 1991. – 200 с.

8. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям (Фитотерапия). – М.: Медицина. – 1990. – 464 с.

9. Федосеева Л.В., Попов Д.М. Количественное определение иридоидов в сырье пустырника// Фармация. – 1997. - № 4. – С. 18-21.

10. Buzogany T., Cucu V. Comparative study between the species *Leonurus cardiaca* L. and *Leonurus quinquelobatus* Gilib Part II. Iridoids// Clujul Medical. – 1983. – Vol. 56. - № 4. – P. 385-388.

#### SUMMARY

Y.A.Haliak, O.M.Chishova

#### QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF IRIDIDS IN DIFFERENCE PARTS OF LEONURUS QUINQUELOBATUS

Iridoid accumulation in some parts *leonurus quinquelobatus* is studied. The optimal time of preparation and conditions of dryer of leafs *leonurus quinquelobatus* were selected.

\*\*\*\*\*